

U. PORTO



FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Antioxidantes e a sua influência na regeneração da mucosa oral

Maria Manuela Machado dos Santos

Orientador

Prof. Dr. João Miguel Silva Costa Rodrigues

Porto 2018

Índice

Agradecimentos	VII
Resumo.....	1
Material e Métodos.....	3
Introdução.....	5
Desenvolvimento	7
Causas de oxidação	7
Radicais livres fisiológicos	7
Sistemas antioxidantes fisiológicos.....	8
Tipos de antioxidantes	9
Mecanismos de cicatrização	10
Mecanismo de ação de antioxidantes	11
Sistemas antioxidantes da pele.....	12
Influência da idade na cicatrização	12
Níveis de antioxidantes em feridas com cicatrização demorada.....	14
Influência do sistema imunitário na cicatrização.....	15
Antioxidantes envolvidos no processo de cicatrização.....	16
Saponinas	16
Carotenóides	16
Curcumina	16
Compostos fenólicos	18
Vitamina E e C	19
Importância de antioxidantes como tratamento.....	20
Utilização profilática.....	20
Atividade anti-úlceras	20
Oxigénio hiperbárico	21
Conclusões	25
Referências.....	27
Anexos.....	29

Índice de Imagens

Figura 1 Radicais criam radicais através de reação com não-radicais.	8
Figura 2 Status antioxidante na pele e tecido de lesão em ratos jovens e velhos.....	14
Figura 3 Influência do sistema imunitário na cicatrização.	15
Figura 4 As Curc-np produziram lesão celular nas MRSA.....	17
Figura 5 HBOT promove a expressão de enzimas antioxidantes.	21
Figura 6 Ação de HBOT sobre iNOS e gp91-phox.	22
Figura 7 HBOT reduziu metaloproteinases da matriz (MMP).	22
Figura 8 HBOT aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias.	23

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João M. S. C. Rodrigues, o meu reconhecimento pela sua compreensão, apoio, dedicação, conhecimento e inesgotável disponibilidade. Por ter tornado o início deste curso mais interessante e pela preciosa ajuda na seleção do tema e durante a elaboração deste trabalho nesta fase final.

Aos meus pais pelos pilares que são na minha vida, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Palavras não chegarão para vos agradecer. Agradeço-vos a ajuda prestada na leitura crítica deste trabalho.

À minha mãe por todo o amor, paciência e dedicação, por ter sofrido nos momentos mais difíceis e respirado de alívio comigo no final de todos esses momentos.

Ao meu pai, pela motivação, compreensão, por toda a ajuda que me deu e por toda que não tive tempo de lhe conceder, por ter tornado tudo isto possível, mas, sobretudo, pelo exemplo de vida que sempre me incutiu.

Às minhas irmãs, por toda a paciência e por todo o amor. Por saber que poderei contar sempre convosco. Por me terem acompanhado nesta aventura do curso e da vida. Vida desde sempre e para sempre partilhada convosco.

Aos meus padrinhos que estiveram presentes todos os dias da minha vida, a quem tenho tanto a agradecer.

Aos meus avós que tantas saudades me deixam. Obrigada pelo apoio que ainda hoje me dão, por esta família que acredito que seja a mais bonita que existe. Que me continuem a guiar.

Ao Paulinho, amigo e namorado, que me acompanhou desde sempre e por ter tornado tudo muito mais fácil. Por me conseguir fazer sorrir todos os dias e por todo o amor, carinho e compreensão. Por me ter acompanhado verdadeiramente nesta luta.

À Belisa, Filipa, Leonor, Linda, Mariana, Tavares, Maria e Daniel por todas as memórias criadas, pela amizade e troca de conhecimentos durante todo o curso. A vós, um agradecimento cheio de carinho pela vossa boa disposição e por todas as confidências.

À Joana e à Ramos que foram amigas que não escolhi, mas que a vida me deu. Que me fizeram rir chorar com quem troquei tantos segredos no quarto 25.

À Nicole, por muitos anos que passem sei que estarás sempre lá, perto ou longe.

Ao Evert, Jorge, Ashanti, Magda, Greta, Mariana, Alessandro e Allison por terem feito parte da aventura mais bonita da minha vida. Por me terem feito amar e viver tanto em 6 meses em Bilbao.

À Dina e à Virgínia, não estaria aqui hoje sem a vossa dedicação e o vosso conhecimento.

À Universidade do Porto, à FMDUP e, um sentido e saudoso obrigada, à FFUP por terem mudado a minha vida para sempre.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização de mais esta etapa.

A todos vós dedico este trabalho. O meu mais sincero, obrigada.

Resumo

Nos últimos anos tem-se estudado o papel dos antioxidantes como substâncias protetoras em vários contextos fisiopatológicos, sendo que os detalhes moleculares inerentes aos seus mecanismos de atuação permanecem ainda por esclarecer em muitos casos. É, no entanto, sabido que o equilíbrio entre os antioxidantes endógenos e exógenos é essencial para otimizar a resposta cicatricial. Neste contexto, são vários os estudos que comprovam que baixas concentrações de espécies reativas de oxigénio ativam a resposta celular das células durante a cicatrização de feridas.

O objetivo desta revisão bibliográfica foi abordar a cicatrização de feridas de forma integrada e aprofundada, no sentido de perceber quais os detalhes bioquímicos, moleculares e fisiológicos inerentes ao mesmo, e de que forma os antioxidantes podem estar envolvidos nas diferentes etapas da resposta cicatricial.

Para tal, recorreu-se à base de dados Pubmed e ao repositório da Universidade do Porto para consulta de artigos científicos em Português e Inglês, dos últimos 20 anos.

São vários os antioxidantes potencialmente envolvidos na cicatrização, sendo que os resultados atuais revelam ainda alguns resultados contraditórios sobre o papel dos mesmos na capacidade reparadora dos tecidos afetados.

De uma forma geral, os antioxidantes melhoram os tempos e a qualidade da cicatrização em comparação com grupos de controle não tratados.

Com base nos mesmos mecanismos necessários para a cicatrização, certos antioxidantes, sob determinadas circunstâncias conseguem apresentar atividade profilática, anti-úlceras e anti-envelhecimento.

Palavras chave

Efeito, antioxidante, cicatrização, cicatrization, stress oxidativo, envelhecimento, radicais livres, espécies reativas de oxigénio, pro-oxidantes

Abstract

In the last years, the role of antioxidants as protective substances in different pathophysiological events has been studied, but many molecular details associated with its mechanism remain uncertain in some cases. Nevertheless, it is well known that a satisfactory balance between endogenous and exogenous antioxidant capacity is essential to optimal responses. Following this idea, it is well established that low concentrations of reactive oxygen species (ROS) activate cell signaling pathways required for wound healing.

The main aim of this paper is to understand in a thorough and integrated way, in order to understand the biochemical, molecular and physiological details inherent to it and how antioxidants may be involved in the different stages of cicatricial response.

During the research it was used data base Pubmed and Porto's University Repository to get scientific articles in portuguese and english, from the last 20 years.

There are several antioxidants studied potentially involved in healing, but it is possible to find some contradictory results about their role in the repair capacity of affected tissues.

In general, antioxidants improve healing timing and its quality compared to untreated or control groups.

Based on the same mechanisms required for healing, certain antioxidants under certain circumstances are able to exhibit prophylactic, anti-ulcer and anti-aging activity.

Key words

Antioxidants, effect, cicatrization, oxidative stress, aging, free radicals, reactive oxygen species, pro-oxidants

Material e Métodos

Para a realização desta revisão bibliográfica recorreu-se à base de dados PUBMED e ao repositório da Universidade do Porto.

Foram selecionados artigos de revisões bibliográficas, revisões sistemáticas e de investigação.

Analisaram-se todos os artigos cujo título e resumo suscitasse interesse e parecessem ir de acordo ao tema em questão. Na sua grande maioria encontravam-se escritos em inglês, e foram publicados nos últimos 20 anos. Em alguns casos, quando houve necessidade de obter um conhecimento mais aprofundado sobre algumas matérias, utilizaram-se alguns artigos mais antigos.

Foram excluídos artigos que depois da leitura do resumo não estivessem relacionados com o tema ou que apesar de relacionados com o tema, implicassem pouca objetividade nesta matéria, resultando num número total de 57 artigos.

Introdução

A importância da nutrição tem sido cada vez mais reconhecida na sociedade moderna, e os antioxidantes têm contribuído para esse cenário, já que se acredita que conseguem prevenir o desenvolvimento de várias doenças crônicas como a diabetes, cancro, doenças cardíacas, enfartes, doença de Alzheimer, artrite reumatóide, cataratas, entre outras. (1-4)

O oxigênio tem um papel essencial no nosso organismo, já que a maioria dos processos fisiológicos acontece sob a presença deste. No entanto, esta substância essencial à vida também pode ter efeitos nefastos que provocam uma destruição celular, causando doenças como as já referidas. Para que tal ocorra, o oxigênio deve ser convertido em espécies químicas altamente reativas, designadas de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas moléculas vão promover a oxidação das biomoléculas, modificando-as e, eventualmente, inativando-as. (1)

Os antioxidantes são substâncias que têm a capacidade de contrariar os efeitos nefastos do processo fisiológico de oxidação que acontece nos tecidos animais. Podem ser nutrientes (vitaminas e minerais) ou enzimas (proteínas) que tomam parte em reações químicas que ocorrem em inúmeros processos no nosso organismo, nomeadamente na melhoria dos processos de cicatrização.(1) Por esta sua capacidade, os compostos bioativos associados aos produtos com capacidade antioxidante têm chamado a atenção de vários investigadores nos últimos anos.(5)

Já que, normalmente, uma lesão leva ao aumento de ROS, uma deficiência intra ou extracelular de certos nutrientes pode criar um stress oxidativo que condicionará a capacidade regeneradora do organismo.(6) Por este motivo é importante compreender que medidas podem melhorar a capacidade antioxidativa de corpo organismo, no sentido de potenciar as suas capacidades e de melhorar a capacidade de resposta ao nível da cicatrização. (2)

Para além disso, com a administração tão frequente de antimicrobianos, a resistência a antibióticos é cada vez mais um problema e a suscetibilidade às doenças aumentou(7). Há uma necessidade de reinventar medicamentos para que haja menos necessidade de utilizar este tipo de drogas e a alternativa poderá ser voltar ao início, ao mais simples, começando numa dieta equilibrada e personalizada a cada tipo de pessoa.(8)

Desenvolvimento

Causas de oxidação

A oxidação é um fenómeno natural associado ao metabolismo celular sendo, por isso, impossível evitar as lesões bioquímicas relacionadas com a atuação de oxidantes. (3, 9)

Os níveis de oxidantes ou radicais livres podem ser aumentados devido a vários fatores, tais como a poluição ambiental(10), uma alimentação desequilibrada, o consumo de bebidas alcoólicas ou hábitos tabágicos, a exposição ao sol ou o stress.(1, 4)

Um radical livre é qualquer átomo ou molécula que contenha um eletrão não emparelhado. Este eletrão altera a reatividade do átomo ou da molécula sendo, normalmente, mais reativo do que o correspondente não-radical. Os radicais livres de oxigénio, têm o seu eletrão não emparelhado associado ao oxigénio e são designados de espécies reativas de oxigénio (ROS). Normalmente estes são representados com um ponto acima da linha.(3)

Radicais livres fisiológicos

Durante o decorrer do seu metabolismo, o ser humano encontra-se continuamente a produzir radicais livres, sendo que os mais comuns são o radical hidroxilo, o radical superóxido ou o óxido nítrico. (3, 4)

No caso do radical hidroxilo (OH^{\bullet}), a sua produção torna-se mais relevante aquando da exposição do nosso organismo a radiação eletromagnética com baixo comprimento de onda, de origem humana ou natural, que promove a clivagem da molécula de água. Uma vez formado, o seu tempo de vida é muito pequeno já que é muito instável nesta forma, reagindo quase simultaneamente à sua formação provocando uma cadeia de reações de radicais livres. (3, 11)

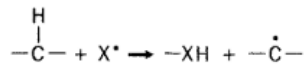
O radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) não é tão reativo como o anterior e, por isso, pode ser criado propositadamente, sendo que uma pequena parte do oxigénio inspirado é usado para essa produção. Quando há ativação de células fagocitárias (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, macrófagos) é libertada uma grande quantidade de superóxido como parte do mecanismo protetor contra o corpo estranho reconhecido. Devido a este fator, a resposta inflamatória tem sempre potencial de causar lesão, sendo que em inflamações crónicas, este mecanismo pode ser particularmente prejudicial. Além disso, o anião superóxido é também continuamente produzido no processo de respiração celular, mais concretamente durante o funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial. (3)

O radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) é menos reativo, tal como acontece com o superóxido, mas, ambos, em certas circunstâncias podem ser tóxicos. No entanto, tal como acontecia com o radical livre anterior, o óxido nítrico desempenha também funções muito importantes, nomeadamente ao nível da vasodilatação e neurotransmissão. (3)

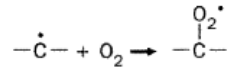
Os radicais livres podem reagir com outros átomos com eletrões não emparelhados e formar uma ligação covalente entre eles, ou então reagir com moléculas não radicais (sem eletrões desemparelhados), como é a maioria das moléculas do nosso organismo. Quando reagem com não-radicaís, os radicais livres deixam de o ser, pois captam um eletrão. No entanto, dão início a uma cadeia de propagação de radicais livres havendo sempre produção de novos oxidantes (ao captarem um eletrão, transformam a molécula dadora do mesmo num radical livre), acarretando consequências potencialmente negativas para o organismo (figura 1). (3)

Peroxidação lipídica

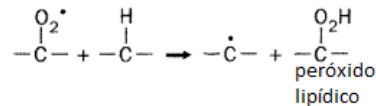
Radical livre remove H de uma das cadeias de um ácido gordo insaturado de uma membrana celular ou lipoproteína deixando um elétron desemparelhado:



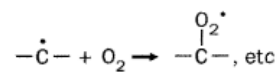
Radical de Carbono reage com oxigênio:



Radical de peróxido ataca uma cadeia adjacente do ácido gordo criando um novo radical de carbono:



Cadeia de reações continua:



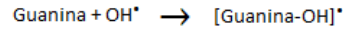
O ataque de uma espécie reativa, pode oxidar várias cadeias de ácidos gordos, degradando proteínas das membranas, tornando as membranas instáveis ou até levando ao seu colapso.

Ataque de um radical de hidroxil numa guanina de DNA

8-Hidroxiguanina

Lesão mutagénica

Oxidação ↗



8-Hidroxiguanina radical

Redução ↘

Anel aberto de guanina

Pára replicação de DNA,

enzimas de reparação

podem introduzir erros

Figura 1 Radicais criam radicais através de reação com não-radicais.

Descrição de algumas consequências biológicas. Adaptado de (3)

Sistemas antioxidantes fisiológicos

Para fazer face aos ataques dos radicais livres, existem no nosso organismo vários mecanismos antioxidantes de defesa, que podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos. Como exemplos dos primeiros pode destacar-se: (3)

- Superóxido dismutases (SOD), que são enzimas que convertem o superóxido em peróxido de Hidrogénio:
 $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
- Glutathione peroxidases (GSH) removem o peróxido de hidrogénio produzido pelas SOD no citosol e na mitocôndria através da oxidação da glutathione (GSSH)
 $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSH} + 2\text{H}_2\text{O}$

Como genericamente os mecanismos de defesa não são suficientes para lidar com as ROS a que o nosso corpo está exposto diariamente, existem ainda umas enzimas, maioritariamente intracelulares, que destroem as moléculas afetadas pelos radicais livres, que removem os ácidos gordos oxidados das membranas e que reparam as lesões de radicais livres no ADN.

Existem também outros mecanismos antioxidantes extracelulares(3), nomeadamente com metais reativos como é o caso do ferro (Fe) (12):

- Proteína transportadora de ferro, transferrina. (3) Esta é a forma mais comum do nosso organismo transferir/obter Fe. (12) Num estudo realizado (13, 14) níveis de hemoglobina e níveis de Fe como a transferrina e ferritina tinham uma correlação forte e positiva com os níveis de enzimas anti-oxidantes como a SOD, CAT e GPx.
- Proteína ligada a iões de ferro lactoferrina. (3) Faz parte da família da transferrina e é conhecida como um imuno-modelador. Tem influência na

homeostasia do Fe, na defesa contra corpos estranhos, funções anti-inflamatória e parece ter influência na regulação da apoptose, limitar angiogénese e capacidade de detetar carcinogénese. Para além disso, também inibe o stress oxidativo não só pela captação de ferro como, de forma independente (sem ser sob a forma “fechada” de holo-lactoferrina), consegue eliminar OH^{\bullet} , proteger o DNA e podem ser incorporadas por neutrófilos e, na altura de infeção impedem a produção de ROS por estas células limitando o dano nos tecidos causado pelo excesso de ROS.(15)

No entanto, a presença de Fe em excesso pode levar ao stress oxidativo.(14) Na presença de ferro reativo, formam-se através de H_2O_2 radicais hidroxilo muito reativos através de reações fenton. Este equilíbrio dos níveis de ferro é importante para a oxigenação do sangue e por isso está, consequentemente, relacionado com o stress oxidativo. (14, 16)

Estas proteínas podem ser encontradas em secreções como lágrimas ou corrimento nasal. (3)

Genericamente, considera-se que ocorre stress oxidativo quando os pró-oxidantes (radicais livres e mecanismos de produção dos mesmos) se encontram mais ativos do que os antioxidantes (mecanismos de neutralização ou impedimento de formação dos pró-oxidantes). Isto pode dever-se a sobreprodução de pró-oxidantes ou carências de antioxidantes.

Tipos de antioxidantes

De uma maneira geral, os antioxidantes não enzimáticos atuam doando um eletrão aos radicais livres convertendo-os em moléculas inofensivas e menos reativas.

Podem ser classificados de acordo com a sua solubilidade ou com a sua origem.

Com base na solubilidade:

- Solúveis em água
Reagem com os oxidantes no citosol da célula ou no plasma do sangue.
Exemplos: ácido ascórbico (vitamina C), glutatona, ácido lipóico e ácido úrico.
- Solúveis em gordura
Protegem a membrana celular de danos e de peroxidação lipídica.
Podem ser sintetizados pelas células e tecidos ou obtidos pela alimentação.
Exemplos: Carotenos, ubiquinona, vitamina E.

Com base na origem (1):

- Natural
Normalmente encontrados em frutas e vegetais, onde os que têm cores mais fortes são os mais saudáveis.
Endogenamente, são produzidas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e a glutatona peroxidase.
- Sintéticos
Devido à instabilidade associada aos antioxidantes naturais, os sintéticos foram criados para estabilizar óleos e gorduras, numa tentativa de controlar o desenvolvimento de toxicidade.

Exemplos: ETO (etoxiquina), BHT (hidoxitolueno butilado) e BHA (hidroxianisol butilado). BHT e BHA foram inicialmente criados para proteger o petróleo da cola oxidativa, mas são usados na alimentação desde 1954.

No entanto, há estudos que referem que os antioxidantes sintéticos estão associados a toxicidade química que pode estar associado ao desenvolvimento de cancro e lesões no fígado. (17)

- Diversos

Para além destes já referidos parecem existir outras substâncias com características antioxidantes.

Exemplos: selénio e zinco (minerais – são cofatores de enzimas antioxidantes), licopenos (carotenóide mais potente na remoção do anião superóxido). (18)

Mecanismos de cicatrização

A manutenção da integridade estrutural e funcional da pele depende da presença de vários nutrientes. A cicatrização requer competência nos mecanismos de cicatrização, fatores quimióticos, um ambiente que promova a divisão celular e a sua diferenciação. A eliminação de proteínas e minerais através da dieta ou por problemas de má absorção, como acontece em diversos contextos patológicos, pode levar a um desequilíbrio na cicatrização e a um maior risco de desenvolvimento de úlceras crónicas, espessamento ou adelgaçamento da pele, alopecias ou alterações no crescimento das unhas. Apesar de em muitos casos a presença de feridas na pele poder estar associada a deficiências nutricionais, o papel da suplementação nutricional é ainda pouco explorado, até porque existem outros fatores que influenciam a saúde como a idade, sexo, raça, estrato socioeconómico, entre outros.(6)

Para haver cicatrização o organismo tem de passar por um processo dinâmico e complexo com fases de inflamação, proliferação e maturação. A inflamação é uma resposta protetora favorável que faz parte da primeira linha de defesa do organismo.(19, 20) Esta é uma reação fisiológica que nos protege contra corpos estranhos, patógenos humanos ou vírus, podendo ser dividida em aguda ou crónica consoante os mecanismos celulares envolvidos.(21)

No entanto, vários estudos têm demonstrado que a inflamação está associada com o desenvolvimento de doenças crónicas como diabetes, cancro, obesidade, doenças autoimunes...(21) Um fenómeno comum em pacientes com problemas na cicatrização é a resposta de fase aguda aumentada, que está associada a níveis elevados de marcadores inflamatórios. Este fenómeno reduz a síntese de albumina e pré-albumina que são transportadores de vários micronutrientes em circulação e que, conseqüentemente, podem levar a défices nutricionais locais.(2, 21)

Por outro lado, a isquemia é outro fator que influencia a reparação dos tecidos. A isquemia, através da inibição da atividade fibrinolítica, é o maior fator de desenvolvimento de adesão, bandas fibrosas que se formam entre tecidos ou órgãos, normalmente, como consequência pós-cirúrgica, resultado da incisão, cauterização, sutura ou outros traumas. A isquemia pode ser causada por coagulação, ligadura ou desvascularização. Alguns estudos demonstraram que a isquemia e as ROS geradas depois da reperfusão têm um papel determinante na reação inflamatória. (22)

As feridas isquémicas têm, na zona comprometida, moléculas coincidentes com as presentes nas feridas crónicas, como um elevado número de protéases e citocinas inflamatórias.(23)

Por um lado, a adesão pós-operatória não acontece sempre, por outro lado, não é possível fazer a previsão da sua ocorrência, gravidade ou extensão. A isquemia dos tecidos parece ser um dos fatores mais determinantes na formação de adesão. Neste sentido, como, 15 minutos depois da reperfusão, os radicais livres começam a formar-se nos tecidos, se forem administrados antioxidantes 15 minutos antes da reperfusão, podemos ter uma resposta positiva na prevenção no desenvolvimento deste tecido fibroso. Depois da reperfusão acontecer, a administração de antioxidantes não surte nenhum efeito. (22)

Sendo verdade que a formação de adesões é uma consequência da cicatrização, também é verdade que a angiogénese é necessária para a formação das adesões pós-cirúrgicas. Para além disso, as suturas podem contribuir para o desenvolvimento de adesões já que aumentam a isquemia, e a hipóxia é o maior estímulo para a angiogénese. O excesso de produção de ROS pode induzir a ativação de um fator que estimula o processo de regeneração que ativa transcrição de um fator mais potente de crescimento pró-angiogénico como o VEGF.

O VEGF, para além de afetar vasos instáveis aumentando a angiogénese, também previne a apoptose das células endoteliais dos vasos imaturos, promovendo a sua adesão. Por este motivo temos alguns autores a defender que podemos prevenir adesões inibindo a angiogénese. (22)

Os ROS, através de fatores de transcrição sensíveis ao estado-redox (NF- κ B e AP-1) induzem a expressão de moléculas de adesão (ICAM e VCAM), fatores quimiotáticos, citocinas pró-inflamatórias e proteínas de defesa nos vasos. O resultado destes efeitos todos resulta numa resposta inflamatória bruta e na acumulação massiva de macrófagos e células T na parede arterial.(24)

Mecanismo de ação de antioxidantes

Os antioxidantes atuam de duas formas principais. O primeiro é doar um eletrão a radicais livres que se encontrem no organismo interrompendo as cadeias de formação destas substâncias. O segundo envolve a remoção de ROS

O crescente consumo de antioxidantes por causa das suas propriedades protetoras é associado a um estilo de vida saudável. No entanto, o seu impacto tende, por vezes, a ser sobrevalorizado. Conforme referido anteriormente, o fundamental é haver um equilíbrio entre o nível de antioxidantes endógenos e exógenos. Por esse motivo, há estudos que demonstram que há antioxidantes (19) que não melhoram a resposta inflamatória, apesar da sua forte capacidade antioxidante.

Num estudo anterior, feridas foram tratadas com nanopartículas contendo um antioxidante (curcumina) e os cortes histológicos demonstraram grande produção de colagénio, uma boa organização do tecido de granulação, sem sinais de exacerbação da resposta inflamatória assim como uma maior neovascularização em comparação com tecidos não tratados com antioxidantes. Neste mesmo estudo comparou-se a migração de queratinócitos ou fibroblastos e não havia diferença significativa em relação ao grupo não tratado o que corrobora a ideia de que a curcumina parece atuar mais na fase proliferativa do que na migração celular. (20)

Adicionalmente, tem vindo a ser descrito que diferentes micronutrientes antioxidantes podem desempenhar papéis importantes no processo de cicatrização, por exemplo:

- O ácido ascórbico é essencial para a formação de ligações cruzadas entre as fibras de colagénio, maturação dos fibroblastos e para a angiogénese.
- O retinol mantém a integridade da superfície do epitélio e mucosa e participa na formação de tecido fibroso
- O zinco é necessário para a formação de ligações cruzadas de colagénio assim como para a síntese da proteína que se liga ao retinol e o transporta para armazenamento hepático. (2)

Uma vez que as lesões, normalmente, levam ao aumento de ROS, uma deficiência intra ou extracelular destes micronutrientes favorecerá a evolução para uma situação de stress oxidativo que poderá levar a problemas na resolução das lesões. (2, 4)

Baixas concentrações de ROS permitem a ativação das cascatas de sinalização necessárias para a cicatrização de feridas. Adicionalmente, é necessário um equilíbrio adequado entre SOD, GSH e NO, para a remodelação da matriz extracelular. SOD é a primeira linha de defesa contra superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) durante a respiração aeróbia. Como já vimos, estas enzimas convertem aniões superóxidos em peróxido de hidrogénio, por oxidação da GSH, catalisado pela glutathione peroxidase (GPx) ou por redução da GSSH através da glutathione reductase (GSR) promovendo a reciclagem desta molécula essencial para a integridade redox celular. A homeostasia desta molécula chave é também garantida pela sua síntese. (25)

Sistemas antioxidantes da pele

Influência da idade na cicatrização

Segundo o estilo de vida da sociedade moderna, vários fatores têm contribuído para um envelhecimento acelerado associado a uma resposta exacerbada face ao stress oxidativo e inflamação, dois processos intimamente ligados.(26) Um desses fatores é a idade do indivíduo. Com o aumento da idade, vários fatores podem influenciar a capacidade de cicatrização.

Por um lado, há uma maior tendência para a adoção de uma alimentação menos saudável que pode ser justificada por toma de medicamentos que afetam o apetite, fatores psicológicos como depressão, alterações cognitivas ou isolamento, dependência de outros para alimentação, problemas dentários que afetam a mastigação, doenças que afetem a má absorção intestinal, maior necessidade nutricional. Um estudo nutricional concluiu que 50% dos idosos consomem menos de 2/3 da quantidade recomendada de zinco, menos de 1/4 de vitamina B6 e menos de 7% de folato e vitamina B12.(6, 27)

Por outro lado, parece que o envelhecimento resulta de uma resposta exagerada ao stress isquémico que acaba por alterar a expressão de genes, respostas alteradas a fatores de crescimento exógenos e alterações na tradução de cascatas de sinalização. (4, 25) Por este motivo, há muitas enzimas, fatores de crescimentos, proteínas que se apresentam alterados no organismo envelhecido.

- Níveis de GSH diminuídos no fígado e cérebro
- Alterações na reciclagem ou na síntese de GSH levam ao desequilíbrio entre SOD e GSH
- Atividades de catálase diminuídas
- Expressão diminuída da subunidade da glutamato cisteína ligase em músculos sob excesso de esforço(25)

No tecido isquêmico jovem e envelhecido para além dos neutrófilos (que logo no início da resposta inflamatória produzem um ambiente oxidado por produção de ROS libertação destes na ferida), os macrófagos são os tipos celulares mais predominantes nas áreas de ferida exposta (28). De acordo com um estudo (25), os fibroblastos aparecem a partir do dia 10, assim que começa a haver uma organização da derme. No entanto, é de notar que, em comparação com feridas não isquémicas, os fibroblastos mantêm-se desorganizados em vez de paralelos à epiderme até muito mais tarde (até ao 21º dia). Os neutrófilos aparecem sempre em altas concentrações juntamente com os macrófagos até ao dia 21. Também se encontravam macrófagos no tecido de granulação e sob a epiderme de migração nos dias 14-21. A re-epitelização, em feridas isquémicas ainda não tinha ocorrido no dia 21. O epitélio permaneceu mais grosso até ao dia 21 em comparação com as feridas não isquémicas. (25)

O envelhecimento é um processo associado a um aumento da produção de radicais livres que pode levar ao desenvolvimento de diversas patologias, tais como cancro, aterosclerose, hipertensão, demência, doenças imunes(25) e parece ser o maior fator na diminuição da fertilidade com o avançar da idade(29) . Além disso, parece também afetar a produção total de colagénio em resposta a lesões. A taxa de proliferação celular, revascularização, deposição e remodelação de colagénio em zonas de ferida é menor em ratos velhos em comparação com jovens. Estas alterações são associadas a cicatrização mais lenta e menor resistência da cicatriz. (25)

Uma vez que os radicais livres e a velocidade assim como a qualidade da cicatrização estão associados com o envelhecimento, foi realizada uma investigação para perceber se existe alguma correlação entre ambos mostrando, dessa forma, a possível contribuição de alterações nos sistemas de antioxidantes para alterações funcionais do processo. (25, 26)

De uma maneira geral observou-se (figura 2) que ratos mais velhos, em comparação com ratos mais novos, apresentavam:

- A atividade da catalase na pele era 22% inferior
- Ratos velhos apresentaram níveis de GSH 29% mais baixos na pele e 43% mais baixo em feridas; estava ainda diminuída (48%) nos mesmos indivíduos em tecidos de feridas com 7 dias de evolução.
- A atividade de SOD e GPx em ratos velhos era 26% mais elevada do que em indivíduos jovens. (30)
 - Sugere uma capacidade adaptativa destas enzimas face ao stress oxidativo.
 - Pelo motivo acima referido não eram esperados valores menores de GPx. (25)
- No entanto, no tecido de cicatrização de ratos mais velhos os níveis desta enzima eram 45% menores comparativamente com ratos jovens. (30)
- Os tecidos mais velhos tinham 51% menos atividade nas lesões que os tecidos jovens (figura 2a)
- Tanto a pele normal como os tecidos de feridas de animais velhos apresentavam uma formação 70% maior de TBARS. (figura 2c)

- TBARS representam o dano causado pelos radicais livres. Este aumento sugere que o aumento de SOD e GPx não é suficiente para fazer face ao dano causado. (30)

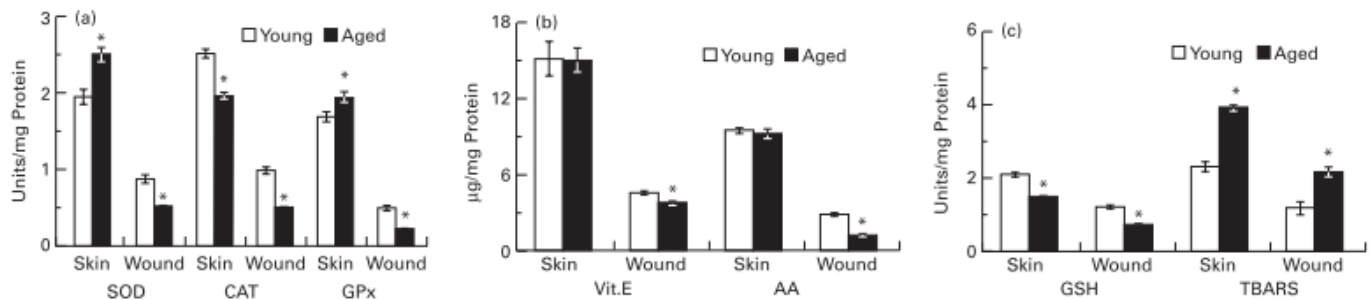


Figura 2 Status antioxidante na pele e tecido de lesão em ratos jovens e velhos.

(a) unidades de SOD representam a quantidade de enzima que inibiu a reação em 50%; a unidade de catálase (CAT) representa a 100nmol de H_2O_2 utilizadas por minuto; a unidade de glutathione peroxidase (GPx) representa 10nmol NADPH oxidado por minuto. (b) quantidade de vitamina E e ácido ascórbico (AA). (c) substâncias reativas de GSH e ácido tiobarbiturico (TBARS) na pele e no tecido lesionado de ratos velhos em comparação com ratos jovens. Valores apresentados na forma de média \pm DP (n=6). * $P \leq 0.05$. Adaptado de (30)

Os estudos demonstram que as feridas em ratos envelhecidos têm um nível de oxidantes menor e um dano oxidativo maior que justifica o atraso na cicatrização destes animais. A citocina anti-inflamatória TGF- β , que é um fator de crescimento local conhecido por reduzir os níveis de superóxido em circulação ao aumentar a expressão de TIMPs e diminuindo a expressão e atividade de MMPs (31), também compromete a cicatrização já que altera a sua função com o aumento da idade corroborando, mais uma vez, a hipótese de que os radicais livres atrasam a cicatrização em ratos velhos.(30)

Há autores que afirmam que a suplementação com um só antioxidante não é suficiente. Por isso, referiram que o stress isquémico sentido por um animal envelhecido leva a um défice combinado de antioxidantes endógenos que culminam num dano oxidativo e excesso de inflamação.(25)

As feridas isquémicas dos roedores analisados são caracterizadas por inflamação prolongada. De uma forma generalizada, as feridas isquémicas são caracterizadas por menos tecido de granulação, grande concentração de neutrófilos e macrófagos (principalmente nos tecidos envelhecidos) e uma capacidade menor de eliminação das células inflamatórias. (25)

Níveis de antioxidantes em feridas com cicatrização demorada

Apesar de haver várias etiologias descritas, o fator comum parece ser níveis muito elevados de espécies reativas de NO em tecido isquémico com consequente stress oxidativo (23)

Não é possível definir uma causa única concreta ou até especificar um conjunto de fatores para os atrasos na cicatrização. No entanto não pode ser ignorada a ligação que existe entre a demora e a presença de radicais livres assim como alteração nos sistemas de eliminação dos mesmos. (30)

Além dos antioxidantes, convém destacar que a glutamina é um aminoácido com um papel fundamental ao nível do fornecimento de azoto para uma proliferação rápida de fibroblastos, células epiteliais e leucócitos. Uma privação deste aminoácido, intra ou

extracelular, comum em situações catabólicas ou póstraumáticas, pode condicionar ainda mais a cicatrização. (2)

Num estudo analisado, comprovou-se que uma suplementação oral de micronutrientes antioxidantes juntamente com glutamina se revelou uma opção terapêutica efetiva. O tempo de encerramento da ferida foi substancialmente menor ao fim de duas semanas quando em comparação com um grupo placebo.

Apesar nos níveis plasmáticos de glutamina se apresentarem normais, intracelularmente pode haver um déficit. Esta suplementação garante não só os níveis plasmáticos desejados, mas também aumenta a disponibilidade intracelular, ajudando nos processos cicatriciais.

A glutamina aumenta a utilização de L-ascorbato pela *Escherichia coli*. Se pudermos extrapolar este resultado para as células humanas, poderá contribuir para uma cicatrização acelerada em pacientes com desordens na cicatrização. (2)

Influência do sistema imunitário na cicatrização

O sistema imunitário tem um papel muito importante na cicatrização. A pele de ratos sem timo mostrou uma atividade mais baixa de SOD, CAT, GPx e um aumento de níveis de GSH quando comparado com a pele de rato normal (figura 4). (30)

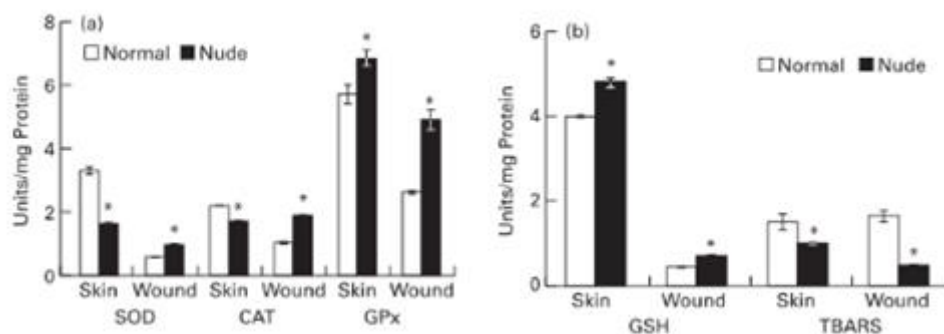


Figura 3 Influência do sistema imunitário na cicatrização.

É possível observar que os ratos imunocomprometidos apresentavam 19% mais de atividade de GPx na pele do que ratos normais e mais 88% num tecido de ferida. Os níveis de glutathione também eram maiores nos roedores imunocomprometidos do que nos normais. Figura de (30)

Quando a pele de um roedor diabético foi comparada com a pele de um não diabético, a primeira apresentou uma atividade da catalase 22% menor e uma tendência a haver menor atividade de SOD.

Quando comparadas as proteínas de uma ferida normal e de uma ferida de cicatrização demorada, foram notadas alterações, por exemplo nos níveis de glutathione, cuja depleção pode justificar o atraso na cicatrização.

No entanto, os ratos sem timo desenvolveram uma capacidade adaptativa demonstrando que os antioxidantes podem não ter um papel não determinante num organismo imunocomprometido. (30)

Antioxidantes envolvidos no processo de cicatrização

Saponinas

Saponinas é o nome coletivo para triterpenos e glicosídeos esteróides. São compostos bioativos de origem vegetal presentes na aveia e na ervilha, por exemplo. Encontra-se também numa planta medicinal utilizada na medicina chinesa.

Parecem ter funções hipocolestereliêmicas, anti-coagulantes, anticarcinogénica, hepato protetoras, hipoglicémicas, neuro protetoras e capacidade imuno modeladora, anti-inflamatórias e antioxidante. (32)

Num estudo realizado (33), os grupos cuja pele de ratinhos foi tratada com diferentes quantidade de *Dipsacus asper*, as atividades de CAT, GSH-Px e SOD assim como de hidroxiprolina foram maiores nos grupos com maior concentração e os valores de lipofuscina foram menores em comparação com grupos não tratados, grupos não tratados envelhecidos e grupos tratados com menor quantidade de saponinas. Este estudo concluiu que esta planta tem propriedades anti-envelhecimento.

Carotenóides

Está presente em todas as frutas e vegetais. Uma alimentação mediterrânica com a presença destes elementos está associada a uma menor incidência de doenças inflamatórias e/ou crónicas.

B-caroteno, luteína e licopenos fazem parte desta categoria e, num estudo realizado, analisando a sua quantidade em pacientes com DPOC ou com doença coronária arterial, os seus níveis estavam claramente diminuídos comparativamente com o grupo controle.

A luteína, por exemplo, atua limitando a libertação de citocinas inflamatórias. O que demonstra o poder anti-inflamatório dos carotenóides.(16)

Curcumina

A Índia tem uma das taxas mais reduzidas do mundo de cancro do cólon, da próstata e do pulmão. Para perceber este fenómeno, alguns estudos apontam para a dieta indiana rica em caril em pó, combinado com outras especiarias, sendo a curcuma o ingrediente principal.

Deriva da curcuma feita de raiz de açafrão ou rizoma e é também designada de turmerico, raiz-de-sol, açafrão-da-índia ou açafrão-da-terra, é usada há mais de 2 500 anos na Índia, inicialmente como corante amarelo e mais tarde como especiaria.

Tem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais, anti-bacterianas, anti-fúngica e anti-cancerígenos. A quantidade máxima recomendada são 12g diárias.(20)

A curcumina in vitro, inibiu o crescimento de bactérias resistentes à metilina como o *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*. (20)

Apesar destas características, tem pouca solubilidade aquosa e o seu perfil de degradação rápido dificulta a sua utilização. Para além disso a utilização de curcumina livre (free curcumin), costuma corar significativamente a pele de laranja. Neste estudo, este compromisso estético foi salvaguardado utilizando curcumina nanoencapsulada. (20)

O encorporamento de antioxidantes em nanocapsuladas manifestou vantagens em termos de problemas com a solubilidade, toxicidade, tempo de vida curto, dispersão no organismo e resistências medicamentosas pelas células-alvo em vários estudos.(18, 34-36)

A curcumina parece atuar na fase proliferativa da cicatrização promovendo a reepitelização, deposição de colagénio, produção de fibronectina e contração. Estas fases parecem ser mediadas por TGF- β 1, síntese de óxido nítrico induzível assim como atividade antioxidante e anti-inflamatória.

Tanto a curcumina como as nanopartículas de curcumina (np-curc) aceleraram a maturação da epiderme com uma ortoqueratose compacto, enquanto outros grupos desenvolveram tecido inflamatório de granulação e a epiderme parcialmente reepitelizada. A grande diferença na utilização deste antioxidante encapsulado e não capsulado foi na derme, onde as feridas tratadas com este continham um grau substancialmente maior de infiltrado inflamatório entre os colagénios recentes e degradados quando comparado com o grupo tratado com np-curc. (20, 37)

A curcumina conseguiu inibir o crescimento de organismos Gram positivos e Gram negativos (figura 5).(20)

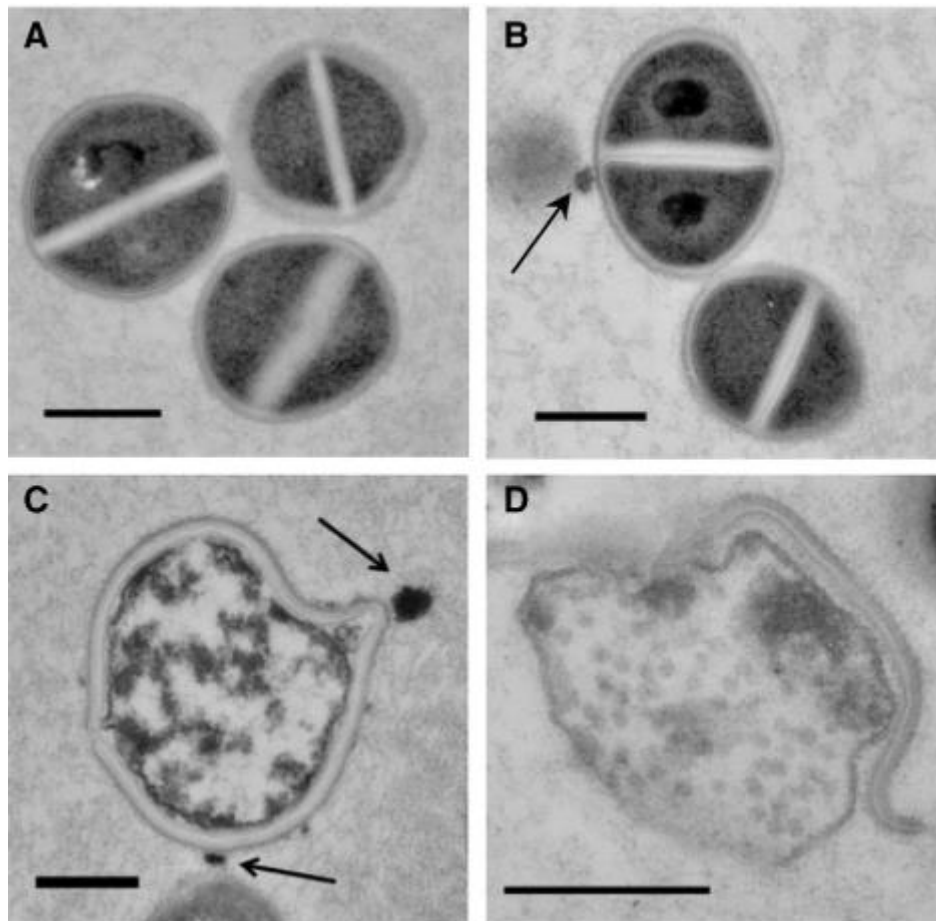


Figura 4 As Curc-np produziram lesão celular nas MRSA.

O microscópio eletrônico de transmissão demonstrou haver interação das nanopartículas com as células MRSA. Em (A) MRSA não tratadas com densidade citoplasmática homogênea com uma parede circundante bem definida. Em (B), depois de 24h, com 5mg/ml de np não apresentava diferenças significativas para o grupo controle. Em (C), depois de 6h, de incubação com 5mg/ml de curc-np, as células exibiram distorção da arquitetura celular e edema, seguido de lise e extrusão do citoplasma ao fim de 24h (D). Figura de (20)

Compostos fenólicos

Cajú

O cajú é um fruto originário do Brasil e divide-se em duas partes: a castanha do cajú e o pseudofruto, um pedúnculo floral que pode apresentar cores entre o amarelo e o vermelho. Este pseudofruto é rico em vitamina C, ácidos orgânicos, antioxidantes, minerais, várias propriedades anti-inflamatórias, antiulcerosas, antibacterianas, antifúngicas e antitumorais. (19) Apresentam também baixos teores de proteínas e lipídios. (38)

O seu perfil fitoquímico revela uma fonte de antioxidantes naturais como compostos fenólicos e carotenóides o que faz com que este pseudofruto consiga eliminar ROS, inibir a formação de radicais livres, prevenir a lesão celular assim como a sua morte. (19)

Apesar da sua grande capacidade antioxidante, não promoveu uma melhor resposta anti-inflamatória e respostas de cicatrização. Este efeito pode ser explicado pelo facto deste tratamento ter uma componente antioxidante tão forte que criou um desequilíbrio tal que fez com que a modulação da resposta inflamatória contra ROS fosse diminuída. (19)

Mel e pólen

Também no caso do mel as vantagens para a saúde são imensas, nomeadamente bactericida e bacteriostáticos, antifúngico, antivírico, antioxidante, anti-inflamatório. (39)

O pólen é o resultado da visita das abelhas a diferentes espécies e a recolha, realizada por elas, de pequenos grãos que, posteriormente, são envolvidos com néctar e enzimas de abelhas. Este produto tem sido usado como alimento e tem tido cada vez mais adesão sendo descrito como nutricionalmente rico. É rico em flavonóides e β -caroteno, mas a sua composição varia já que depende de fatores como a posição geográfica e a estação. (40)

De facto, o principal desafio da fitomedicina na utilização do pólen está relacionado com as variações possíveis relacionadas com a variedade de espécies que pode estar na sua composição, já que torna difícil prever os seus efeitos terapêuticos. (41)

No entanto, o Pólen e os seus produtos podem ser utilizados com segurança (41) e têm sido descritos como tendo diversos benefícios no seu uso em humanos. Tem sido utilizado com sucesso no tratamento de prostatite benigna e dessensibilização por via oral de crianças com alergias ao pólen. Parece também ter uma ação contra a atividade de radicais livres. (39)

Fava de feijão

Parkia speciosa está descrita como tendo propriedades hipoglicémicas, antibacterianas, anticancerígenas e antioxidantes.

Neste teste, a planta demonstrou poder ser usado com segurança e sem toxicidade quando administrada oralmente até 5 g/kg.

Os resultados deste estudo demonstraram que o pré-tratamento com esta planta inibiu significativamente a formação de lesões na mucosa gástrica.

Alguns medicamentos de forramento de estômago funcionam aumentando a quantidade de muco gástrico secretado. O pré-tratamento com *Parkia speciosa* aumentou significativamente a quantidade de muco em roedores com úlceras estomacais induzidas por álcool revelando que o mecanismo de ação é em parte com base na preservação do muco da parede gástrica.

O consumo oral da *Parkia speciosa* parece levar à formação de complexos entre esta e o muco gástrico que a protegem de agentes necrotizantes que possam estar no estômago. Pode

também ser inferido que a proteção se dá por aumentar a resistência da barreira mucal, por ação de uma camada protetora, que impediu a infiltração leucocitária na parede gástrica. (42)

Clausena excavata extract

Clausena excavata (da família *Rutaceae*) é uma árvore frutífera de fácil cultivo de origem asiática e parente dos citrinos. As folhas são, normalmente, utilizadas para o tratamento da malária, dores abdominais e de cabeça, gripes, tuberculose pulmonar, mordeduras de cobra e outros envenenamentos, diarreia e feridas. Também foi descrita como tendo capacidades antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias, antivíricas, anticancerígenas, antifúngicas, antimicobacterianas e imunomodulador.

As fortes propriedades antioxidantes de *C. excavata* estão fortemente associadas com o seu conteúdo fenólico/flavenóide.

Na cura de úlceras gástricas os macrófagos produzem um fator “colony-stimulating” que tem um papel importante já que promove a angiogénese.

A atividade anti-úlceras não é absoluta, mas o extrato metanólico das folhas de *C. excavata* parece ter uma capacidade de inibir a morte prematura de células da mucosa gástrica, um efeito gastroprotetor.

Para além disso, este extrato antioxidante não apresentou toxicidade na linha celular macrófaga mesmo em doses elevadas. (43)

Vitamina E e C

A vitamina C (VC) pode ser encontrada em frutas e vegetais, estando, de uma forma geral, em maior quantidade dos alimentos com cores mais vivas como o pimento vermelho ou a goiaba, por exemplo. A vitamina E (VE) está presente na maioria dos alimentos, mas, em maior quantidade, em sementes e frutos secos como sementes de girassol, amêndoas e avelãs. (22)

A VC é uma molécula hidrossolúvel, com baixo peso molecular e essencial na síntese de colagénio e preservação de status redox celular. É um dos antioxidantes presente no plasma humano e na membrana celular. É o inibidor mais forte da peroxidação lipídica da membrana plasmática e eficaz na eliminação de ROS. A VC também estabiliza os níveis de VE e promove a absorção de Fe. (44) A VE tem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticoagulantes e antifibrótico/fibrinolítico, já que reduz a produção de colagénio. (22)

Alguns estudos mostram que a VE tem sucesso na redução da adesão pós-cirúrgica em ratos. (22) Num dos estudos, Yetkin demonstrou que neovascularização, inflamação e a fibrose foram menores no grupo tratado com VE. (45)

Para além de testes em animais, há estudos em humanos onde o uso crónico de VC e VE em casos com história de cancro e riscos cardiovasculares demonstrou um efeito antioangiogénico e até redução de massas tumorais. (22)

Tanto a VC como a VE preveniram a formação da adesão pós-cirúrgica. (22)

A VC e a VE foram administradas intra peritonealmente 15 minutos antes da incisão. Como a formação de adesão foi diminuída nestes grupos esta injeção de antioxidante 15 minutos antes sugere que os antioxidantes são úteis na sua prevenção. Isto parece dever-se ao factor de prevenir a angiogenesis. (22)

Neste estudo, o fator de crescimento endotelial vascular encontrou-se em grande quantidade no grupo que apresentava adesões em comparação com o controlo ou com os grupos tratados com VC e VE. Como o VEGF é um fator importante na formação de adesão, a ação da

VC e VE preveniu a adesão eliminando a liberação de mediadores de angiogenesis e do próprio VEGF. (22, 45)

Importância de antioxidantes como tratamento

Neste momento, os antimicrobianos comercializados apresentam várias limitações associadas à sua toxicidade, cobertura antimicrobiana insuficiente/incompleta, penetração inadequada na zona de ferida e até favorecimento de bactérias resistentes. (20)

O conjunto de stress a que somos expostos, radiação UV, temperaturas elevadas, stresses ambientais causam este estado crónico de stress oxidativo. Esta situação incentiva o desenvolvimento de mecanismos antioxidantes cada vez mais eficazes. Isto afeta também as bactérias patogénicas.(46) Esta seleção natural de bactérias levará a uma progressiva e contagiante resistência a antibióticos aumentando a probabilidade de haver números maiores de mortes associadas a infeções.(8)

Utilizando produtos naturais, teremos menos efeitos secundários (43) e baixa probabilidade de desenvolverem resistência microbiana.(47)

Os produtos naturais, nomeadamente os antioxidantes, poderão ter inúmeras aplicações no desenvolvimento de dietas funcionais, produtos na área da saúde e cosmética e medicamentos.(17)

Utilização profilática

O crescente consumo de antioxidantes por causa das suas propriedades protetoras é associado a um estilo de vida saudável. No entanto, o seu valor pode ser sobrevalorizado. Como já vimos, o fundamental é haver um equilíbrio entre o nível de antioxidantes endógenos e exógenos.

Por esse motivo, há estudos que demonstram que há antioxidantes (como RCAJ) que não melhoram a resposta inflamatória devido à forte capacidade antioxidante. Na verdade, o tratamento profilático de 30 dias aumentou de tal forma o nível de antioxidantes que diminuiu a modulação da resposta inflamatória provocada por ROS. Assumindo uma suplementação em antioxidantes de tal forma elevada podemos imaginar até um atraso na cicatrização. É por isso necessário alertar para a possibilidade da suplementação antioxidantes em excesso pode ser nefasta ou acarretar um potencial risco tóxico, sob certas circunstâncias com certas estruturas como acontece com algumas vitaminas ou com fenólicos fitoquímicos.(38)

Porém, realçando uma vez mais a importância do equilíbrio entre anti e pro-oxidantes, há alguns estudos que demonstraram sucesso na utilização de antioxidantes profilaticamente.(43, 48-50)

Atividade anti-úlceras

Assim como as pessoas idosas, aqueles que apresentam úlceras crónicas apresentam níveis reduzidos de vitaminas A, E, zinco e carotenos. Um estudo prospetivo encontrou uma prevalência maior de deficiências proteicas nos pacientes com úlceras crónicas nas pernas em comparação com os que não apresentavam essas lesões. (6)

A deficiência proteica está fortemente associada com um pior prognóstico de cura enquanto que a presença de um síndrome inflamatório está associado à ocorrência de complicações com as feridas.

Estudos em pacientes queimados também sugeriram que a suplementação em cobre, selênio e zinco levava à normalização dos níveis de enzimas antioxidantes e glutatona na pele, à diminuição da necessidade de se realizarem cirurgias e a uma taxa de sucesso maior nos casos de enxertos de tecidos.(4)

De acordo com vários estudos, a suplementação com antioxidantes parece ajudar realmente no desenvolvimento de úlceras corrigindo a peroxidação lipídica que acontece nestes casos, reduzindo fatores pró-apoptóticos assim como aumentando os níveis das enzimas antioxidantes.(51, 52)

Oxigênio hiperbárico

É sabido que a presença de ROS é importante para o tratamento com oxigênio hiperbárico (HBOT), mas a forma como o tratamento influencia a cascata de sinalização das ROS na ferida e a forma como protege o tecido do stress oxidativo é ainda desconhecida. (23)

O tratamento com oxigênio hiperbárico atua a nível local e sistêmico. Localmente reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, acelera a destruição de elementos oxidantes e induz a transcrição de enzimas antioxidantes - tornando o ambiente mais reduzido -, diminui a apoptose e modula a ativação e adesão de leucócitos. A nível sistêmico, o HBOT tem efeitos no sistema imune e inflamatório, reduzindo a resposta a antígeno, reduzindo os linfócitos e leucócitos em circulação induz a libertação de células-mae endoteliais.(23, 24, 53)

Em tecidos isquémicos tratados com oxigênio hiperbárico, melhorou-se a expressão de enzimas antioxidantes (Cu/Zn-superoxide dismutase, catalase e glutatona peroxidase) e, para além disso, também se obtiveram uns níveis menores de enzimas pro-oxidantes. (figura 6) (23)

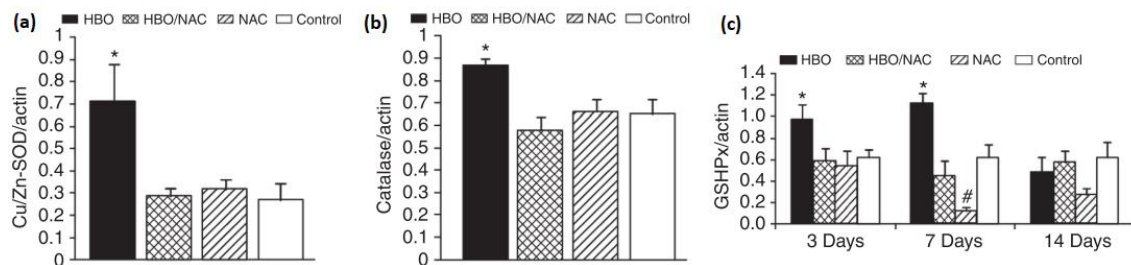


Figura 5 HBOT promove a expressão de enzimas antioxidantes.

Quantificação com desimetria revelou que HBOT aumentou significativamente a expressão de Cu/Zn-SOD, (b) catalase, no dia 7 e (c) GSHPx, nos dias 3 e 7. Figura adaptada de (23).

Depois deste tratamento, os tecidos também revelaram menos espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RNS). Neste sentido, foi possível minimizar a produção de peroxinitrite que é um forte oxidante resultante dos elevados níveis de NO que é capaz de penetrar as células com efeitos tóxicos no ADN e membrana fosfolipídica das células. O seu principal papel é oxidação ou nitratação de aminoácidos como a tirosina. (23)

O HBOT conseguiu diminuir a síntese de óxido nítrico induzível (iNOS), mas não conseguiu influenciar a função de NOS endotelial. Em tecidos não isquémicos a quantidade de iNOS assim como de NOS é muito menor. (figura 7 (a))

A proteína gp91-phox é uma proteína latente nos fagócitos pronta para se manifestar produzindo ROS quando os fagócitos são ativados em situação de necessidades respiratórias intensas.(54) Com o HBOT os níveis desta proteína reduziram. (figura 7 (b))

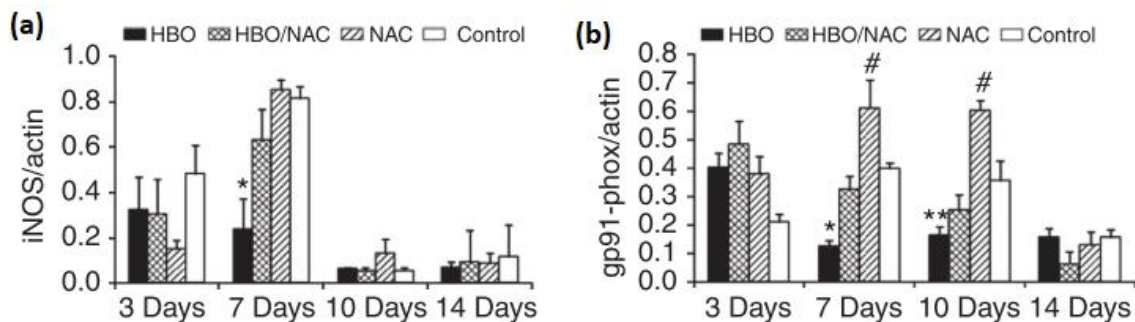


Figura 6 Ação de HBOT sobre iNOS e gp91-phox.

A análise de densimetria mostrou que o HBOT reduziu significativamente as iNOS, no dia 7, e (b) de gp91-phox, no 7º e 10º dia. Figura adaptada de (23)

Neste trabalho ainda não foi referido o papel das metaloproteinases (MMP), mas serão enzimas brevemente abordadas já que têm um papel importante na sinalização de processos de cicatrização, reabsorção óssea e angiogénese. (55) Estão tão associadas à remodelação da matriz extracelular danificada e à cicatrização de feridas, com uma ação catabólica. No entanto, quando atuam de forma desorganizada contribuem significativamente para o envelhecimento. A presença destas no tecido pré-senescente é baixa, mas à medida que envelhecemos a expressão dos seus inibidores (TIMP) vai diminuindo e, consequentemente, a sua expressão é maior.(56)

O equilíbrio entre as MMP e os TIMP parece ser crucial na fisiopatologia das feridas crónicas. Com HBOT, os valores de MMP reduziram significativamente provavelmente como consequência do aumento do inibidor TIMP-2 (figura 9). O HBOT aumentou também a deposição de colagénio e melhorou a capacidade de fecho da ferida. (figura 8) (23)

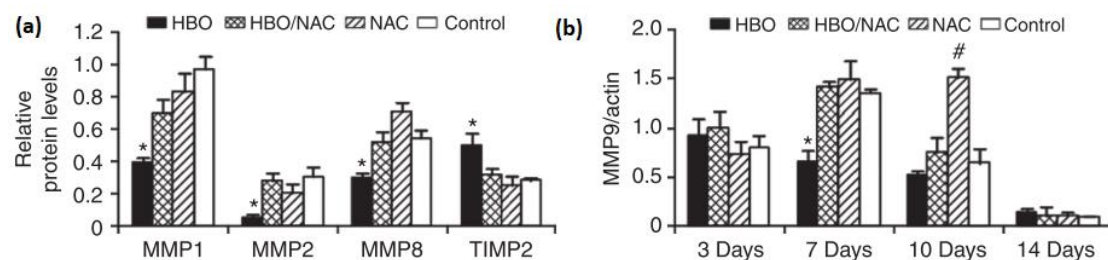


Figura 7 HBOT reduziu metaloproteinases da matriz (MMP).

(a) é possível ver como o tratamento com HBOT consegue reduzir significativamente a MMP1, MMP2 e MMP8 e como aumentou, também significativamente, os níveis de TIMP2 em tecido isquémico, comparativamente com outros grupos com outros tipos de tratamento. (b) O HBOT diminuiu a MMP9 significativamente comparativamente com outros grupos no 7º dia. Figura adaptada de (23)

Este tratamento conseguiu também, como já foi referido, aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Neste estudo, houve uma estimulação policlonal com um anticorpo. Como visível na figura 10, as células submetidas a HBOT secretaram ainda maior quantidade que os grupos não tratados com HBOT com ou sem presença de anticorpo sugerindo que este tratamento tem uma ação ampla nas respostas imunes adaptativas.(24)

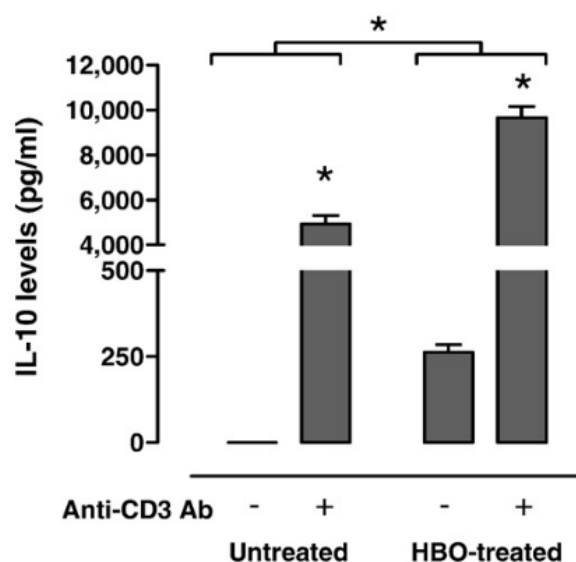


Figura 8 HBOT aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias.

IL-10 por estimulação de células T esplênicas. Estimulação policlonal foi conseguida através do anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 por 4 dias. Figura de (24)

Apesar de parecer certo que o HBOT melhorou a cicatrização, ainda não é completamente compreendido o mecanismo pelo qual o HBOT melhora a cicatrização.(23)

Para além de todas as influências acima referidas, o HBOT parece diminuir a infiltração de neutrófilos nas feridas isquémicas, reduzir a apoptose aumentando a expressão de Bcl-2 e diminuindo a produção de fatores induzidos pela hipóxia sem favorecer um aumento na proliferação celular, diminui os danos no ADN, reduz a inflamação, diminui a produção de ciclooxygenase-2.(57)

Nos estudos neste capítulo referidos, os autores referiram não ter havido efeitos adversos nos roedores tratados com HBOT, mas os resultados parecem ter sido mais positivos nas feridas isquémicas mais do que nas não-isquémicas. (23, 24, 57)

Conclusões

A cicatrização é um processo que envolve várias fases e a descoordenação nestas fases pode levar a um atraso no processo de cicatrização. Os fatores podem ser locais, como trauma e déficit de oxigenação, ou sistêmicos como hipoxia, doenças autoimunes, alguns medicamentos ou má nutrição e falta de hidratação.

Com base neste trabalho, é possível concluir que com o envelhecimento, a disfunção das enzimas antioxidantes de defesa resulta numa sinalização anormal de ROS.

Para além disso, atualmente não parecem existir formas eficazes de prevenir de forma significativa a formação de adesões pós-cirúrgicas. Porém, aplicando técnicas minimamente invasivas e tendo em conta os níveis de antioxidantes, por exemplo injetando-os na zona agredida sob certas condições, parece reduzir este tipo de situações.

Sob um ponto de vista preventivo, os níveis de antioxidantes, em organismos saudáveis, podem ser controlados e mantidos essencialmente com uma dieta equilibrada. A dieta mediterrânica tradicional por conter baixas quantidades de gordura saturada e carnes vermelhas e pela presença significativa de vegetais, leguminosas e peixe é uma opção que poderá ser uma mais-valia neste contexto.

O objetivo desta revisão era fazer um balanço de fatores que influenciam a cicatrização e prevenir problemas com base nos que podem ser manipulados e para orientação de estudos futuros direcionados aos que não ainda conseguimos controlar. Parece existir um elevado potencial na utilização de antioxidantes com objetivos farmacológicos, mas a criação de antioxidantes exige a compreensão do seu mecanismo de ação tendo em conta o design destas moléculas, particularmente em relação à interação com a membrana das bactérias.

Referências

1. Kumar S, Sharma S, Vasudeva N. Review on antioxidants and evaluation procedures. Chinese journal of integrative medicine. 2017.
2. Sandra C. Blass HG, René H. Tolba, Birgit Stoffel-Wagner, Koroush Kabir, Christof Burger, Peter Stehle, Sabine Ellinger. Time to wound closure in trauma patients with disorders in wound healing is shortened by supplements containing antioxidant micronutrients and glutamine: A PRCT. Clinical Nutrition. 2012;31:469-75.
3. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet (London, England). 1994;344(8924):721-4.
4. V. Lobo AP, A. Phatak, N. Chandra. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews. 2010;4(8):118-26.
5. Carneiro NS, Alves CCF, Alves JM, Egea MB, Martins CHG, Silva TS, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2017;89(3):1907-15.
6. Katherine L. Brown TJP. Nutrition and wound healing. Clinics in Dermatology. 2010;28:432-9.
7. Blaskovich MAT. The Fight Against Antimicrobial Resistance Is Confounded by a Global Increase in Antibiotic Usage. ACS infectious diseases. 2018.
8. Pempek JA, Holder E, Proudfoot KL, Masterson M, Habing G. Short communication: Investigation of antibiotic alternatives to improve health and growth of veal calves. Journal of dairy science. 2018;101(5):4473-8.
9. Yu P, Wu G, Lee HW, Simons M. Endothelial Metabolic Control of Lymphangiogenesis. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 2018:e1700245.
10. Pomatto LCD, Cline M, Woodward N, Pakbin P, Sioutas C, Morgan TE, et al. Aging attenuates redox adaptive homeostasis and proteostasis in female mice exposed to traffic-derived nanoparticles ('vehicular smog'). Free radical biology & medicine. 2018;121:86-97.
11. Kanakaraju D, Glass BD, Oelgemoller M. Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. Journal of environmental management. 2018;219:189-207.
12. Rishi G, Subramaniam VN. The relationship between systemic iron homeostasis and erythropoiesis. Bioscience reports. 2017;37(6).
13. Zaka-Ur-Rab Z, Adnan M, Ahmad SM, Islam N. Effect of Oral Iron on Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Children with Iron Deficiency Anaemia. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR. 2016;10(10):Sc13-sc9.
14. Colak E, Zoric L, Radosavljevic A, Ignjatovic S. The Association of Serum Iron-Binding Proteins and the Antioxidant Parameter Levels in Age-Related Macular Degeneration. Current eye research. 2018;43(5):659-65.
15. Mayeur S, Spahis S, Pouliot Y, Levy E. Lactoferrin, a Pleiotropic Protein in Health and Disease. Antioxidants & redox signaling. 2016;24(14):813-36.
16. Kentson M, Leanderson P, Jacobson P, Persson HL. Oxidant status, iron homeostasis, and carotenoid levels of COPD patients with advanced disease and LTOT. European clinical respiratory journal. 2018;5(1):1447221.
17. Sun H, Mu B, Song Z, Ma Z, Mu T. The In Vitro Antioxidant Activity and Inhibition of Intracellular Reactive Oxygen Species of Sweet Potato Leaf Polyphenols. Oxidative medicine and cellular longevity. 2018;2018:9017828.
18. Jain A, Sharma G, Ghoshal G, Kesharwani P, Singh B, Shivhare US, et al. Lycopene loaded whey protein isolate nanoparticles: An innovative endeavor for enhanced bioavailability of lycopene and anti-cancer activity. International journal of pharmaceutics. 2018.
19. al. Ve. Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. Experimental Biology and Medicine. 2015;240.
20. Aimee E. Krausz BLAao. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2015.
21. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, et al. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016;2016:5276130.
22. Atilgan R KT, Ozkan ZS, Kavak SB, Kumbak B, Deveci D, Simsek M, Baspinar M, Sapmaz E. Evaluation of vitamin C and vitamin E for prevention of post operative adhesion: A rat uterine horn model study. Journal Obstetrics Gynaecology Research. 2015;41(3):418-28.
23. QixuZhang LJG. Hyperbaric Oxygen Reduces Matrix Metalloproteinases in Ischemic Wounds through a Redox-Dependent Mechanism. Journal of Investigative Dermatology. 2014;134(1).
24. Bhalchandra Kudchodkar HJ, Jerry Simecka, Ladislav Dory. Hyperbaric oxygen treatment attenuates the pro-inflammatory and immune responses in apolipoprotein E knockout mice Clinical Immunology. 2008;128.
25. Andrea N. Moor ET, Jamie L. Prather, Michelle Jung & Jonathan J. Lopez, Sarah Connors, Lisa J. Gould. Consequences of age on ischemic wound healing in rats: altered antioxidant activity and delayed wound closure. Age (Dordr). 2014;36.
26. Smith C. Natural antioxidants in prevention of accelerated ageing: a departure from conventional paradigms required. Journal of physiology and biochemistry. 2018.
27. Assmann KE, Adjibade M, Shivappa N, Hebert JR, Wirth MD, Touvier M, et al. The Inflammatory Potential of the Diet at Midlife Is Associated with Later Healthy Aging in French Adults. The Journal of nutrition. 2018;148(3):437-44.
28. Burgoyne JR. Oxidative stress impairs autophagy through oxidation of ATG3 and ATG7. Autophagy. 2018;1-2.
29. Selvaratnam JS, Robaire B. Effects of Aging and Oxidative Stress on Spermatozoa of Superoxide-Dismutase 1- and Catalase-Null Mice. Biology of reproduction. 2016;95(3):60.
30. SHUKLA AMRAA. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. International Journal of Experimental Pathology. 2000;81.

Antioxidantes e a sua influência na regeneração da mucosa oral

31. Cardoso ACJ. Efeitos da terapêutica com células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea na expressão da citocina pró-fibrótica TGF- β 1 no endométrico de éguas com endometriose. UNIVERSIDADE DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária. 2015.
32. Rao AV, Gurfinkel DM. The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug metabolism and drug interactions*. 2000;17(1-4):211-35.
33. Wan QY, Song LJ. [Study of anti-aging effect and its mechanism of total saponins of Wu-He *Dipsacus asper* on skin of mouse-aging model]. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese journal of applied physiology*. 2015;31(2):166-9.
34. Reimondez-Troitino S, Alcalde I, Csaba N, Inigo-Portugues A, de la Fuente M, Bech F, et al. Polymeric nanocapsules: a potential new therapy for corneal wound healing. *Drug delivery and translational research*. 2016;6(6):708-21.
35. Pegoraro NS, Mattiazzi J, da Silveira EF, Azambuja JH, Braganhol E, Cruz L. Improved photostability and cytotoxic effect of coenzyme Q10 by its association with vitamin E acetate in polymeric nanocapsules. *Pharmaceutical development and technology*. 2018;23(4):400-6.
36. Carbone C, Arena E, Pepe V, Prezzavento O, Cacciatore I, Turkez H, et al. Nanoencapsulation strategies for the delivery of novel bifunctional antioxidant/sigma1 selective ligands. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2017;155:238-47.
37. Kiran Kumar Chereddy RC, Patrick B. Memvanga, Bernard Ucakar, Anne des Rieux, Gaëlle Vandermeulen, Véronique Prêat Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *Journal of Controlled Release*. 2013.
38. Maressa Stephanie Ovidio ALVES AMA, Maria Margareth Veloso NAVES*. Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2013; 72(4):327-31.
39. al Ce. The effect of oral honey and pollen on postoperative intraabdominal adhesions. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 2011;22(1):65-72.
40. van den Driessche JJ, Plat J, Mensink RP. Effects of superfoods on risk factors of metabolic syndrome: a systematic review of human intervention trials. *Food & function*. 2018.
41. Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the science of food and agriculture*. 2016;96(13):4303-9.
42. Rami Al Batran FA-B, Mazen M. Jamil Al-Obaidi, Abdualrahman Mohammed Abdulkader, Hamid A. Hadi, Hapipah Mohd Ali, Mahmood Ameen Abdulla. In Vivo Antioxidant and Antiulcer Activity of *Parkia speciosa* Ethanolic Leaf Extract against Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Rats. *PLoS One*. 2013;8(5).
43. Shaymaa Fadhel Abbas Albaayit YA, Rasedee Abdullah and Noorlidah Abdullah. Prophylactic effects of *Clausena excavata* Burum. f. leaf extract in ethanol-induced gastric ulcers. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016;10.
44. Abdullah M, Attia FN. Vitamin, C (Ascorbic Acid). *StatPearls. Treasure Island (FL)*2018.
45. S.J. Muzaffar JCP, S.J. Southern. Vitamin E - an aid to wound healing? *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2011.
46. Zhang LB, Feng MG. Antioxidant enzymes and their contributions to biological control potential of fungal insect pathogens. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018.
47. Lorenzon EN, Nobre TM, Caseli L, Cilli EM, da Hora GCA, Soares TA, et al. The "pre-assembled state" of magainin 2 lysine-linked dimer determines its enhanced antimicrobial activity. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2018;167:432-40.
48. Asma B, Vicky L, Stephanie D, Yves D, Amy H, Sylvie D. Standardised high dose versus low dose cranberry Proanthocyanidin extracts for the prevention of recurrent urinary tract infection in healthy women [PACCANN]: a double blind randomised controlled trial protocol. *BMC urology*. 2018;18(1):29.
49. Kolarzyk E, Skop-Lewandowska A, Jaworska J, Ostachowska-Gasior A, Krzeszowska-Rosiek T. Dietary intake of antioxidants and fats in the context of coronary heart disease prevention among elderly people. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*. 2018;25(1):131-6.
50. Ilic BS, Kolarevic A, Kocic G, Smelcerovic A. Ascorbic acid as DNase I inhibitor in prevention of male infertility. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;498(4):1073-7.
51. Selmi S, Rtibi K, Grami D, Sebai H, Marzouki L. Protective effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat. *Lipids in health and disease*. 2017;16(1):152.
52. Yang Y, Yin B, Lv L, Wang Z, He J, Chen Z, et al. Gastroprotective effect of aucubin against ethanol-induced gastric mucosal injury in mice. *Life sciences*. 2017;189:44-51.
53. Buckley CJ, Cooper JS. Hyperbaric, Angiogenesis. *StatPearls. Treasure Island (FL)*2018.
54. Green SP, Cairns B, Rae J, Errett-Baroncini C, Hongo JA, Erickson RW, et al. Induction of gp91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2001;21(4):374-84.
55. Swetha R, Gayen C, Kumar D, Singh TD, Modi G, Singh SK. Biomolecular basis of matrix metallo proteinase-9 activity. *Future medicinal chemistry*. 2018.
56. Cerofolini L, Fragai M, Luchinat C. Mechanism and Inhibition of Matrix Metalloproteinases. *Current medicinal chemistry*. 2018.
57. Bhalchandra Kudchodkar HJ, Jerry Simecka, Ladislav Dory. Hyperbaric Oxygen Attenuates Apoptosis and Decreases Inflammation in an Ischemic Wound Model. *Clinical Immunology*. 2008;128(3):435-41.

Anexos

Declaração

Monografia de Investigação/ Relatório de Atividade Clínica

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica, integrado no Mestrado Integrado em Medicina Dentária, da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Porto, 17 Maio de 2018

Maria Mameia Machado do Santos.

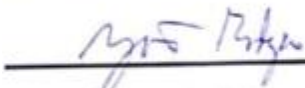
(A autora)

Parecer do Orientador

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pela estudante Maria Manuela Machado dos Santos, com o título: “Antioxidantes e a sua influência na regeneração da mucosa oral”, está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, pois foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 17 Maio de 2018

O orientador



(Prof. Dr. João Miguel Silva Costa Rodrigues)